

Estudios de bioadsorción de plomo por *Saccharomyces cereviceae* en soluciones acuosas

Studies of lead biosorption by *Saccharomyces cereviceae* in aqueous solutions

Juan José Pauro Roque¹, Martín Choque Yucra²,
Roger Poccohuanca Aguilar³, Alfredo Mamani Canqui⁴

Resumen

El ecosistema del lago Titicaca (Puno, Perú) y sus tributarios, viene siendo perturbado por metales pesados producto de la actividad minera emergente. Para controlar y reducir la contaminación existen procesos biológicos llevados a cabo por microorganismos como las levaduras (biorremediación). Este trabajo de investigación tiene como objetivos evaluar la capacidad de bioadsorción de plomo mediante *Saccharomyces cereviceae* en soluciones acuosas y la influencia de dos niveles de pH durante la bioadsorción. Para esto se ensayaron dos concentraciones de *S. cereviceae* (cel/mL), las cuales fueron cuantificadas por un hemocitómetro y luego traspasadas a una solución con concentraciones conocidas de plomo (5 y 25 mg/L). Se realizaron lecturas de las concentraciones de plomo a los 5, 60 y 120 minutos. La mayor capacidad de bioadsorción resultó cuando *S. cereviceae* estaba a una concentración de 5×10^6 cel/mL, y el pH óptimo fue de 5,14. Se concluye que *S. cereviceae* constituye una buena alternativa para la bioadsorción de plomo, quedando abierta su validación en condiciones de campo en el altiplano peruano.

Palabras clave: bioadsorción, plomo, levadura.

Abstract

Lake Titicaca's ecosystem and that of its tributaries in Puno (Peru) are being disturbed by heavy metals resulting from emergent mineral activity. Biological processes involving microorganisms such as yeasts (bioremediation) are being used for controlling and reducing such pollution. This research was aimed at evaluating *Saccharomyces cereviceae*'s lead biosorption capacity in aqueous solutions and evaluating the influence of two pH levels on biosorption. Two *S. cereviceae* concentrations (cel/mL) were tested; these concentrations were quantified

-
- 1 Licenciado en biología; microbiólogo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano, Urb. Villa del Lago H-20, Puno, Perú. jjpauro@hotmail.com
 - 2 Ingeniero agrónomo, analista, Laboratorio de Investigación y Control de Calidad Ambiental, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú.
 - 3 Licenciado en biología; ecólogo, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú.
 - 4 Ingeniero metalúrgico. Facultad de Ingeniería Geológica y Metalúrgica. Universidad Nacional del Altiplano. Puno. Perú.

in a haemocytometer and then put into a solution having a known lead concentration (5 and 25 mg/L). Lead concentrations were read after 5, 60 and 120 minutes. The results revealed that the best biosorption level was obtained with a 5×10^6 cel/mL *S. cereviceae* concentration at 5.14 pH. *S. cereviceae* thus constitute a good alternative for lead biosorption; however, its validation in Peruvian altiplano field conditions remains to be tested.

Key words: Biosorption, lead, yeast.

Recibido: septiembre 9 de 2008 Aprobado: mayo 13 de 2009

Introducción

El Titicaca es el lago navegable más alto del mundo y una de las maravillas naturales del Perú, se encuentra ubicado sobre los 3820 msnm, y constituye una fuente de agua dulce muy importante, así como también es fuente de recursos hidro-biológicos y forrajeros para la población que habita las zonas circunlacustres.

En los últimos años el Titicaca viene siendo contaminado por metales pesados, producto de los efluentes mineros que se vierten directamente a los tributarios que finalmente desembocan en el lago. El plomo es uno de esos contaminantes, es un metal pesado muy difundido que se utiliza para la producción de barnices, esmaltes, vidrio, pinturas, plásticos, entre otros (Kiely, 1999); así mismo, se encuentra en el revestimiento de cables, como componentes de soldadura y como empaste en la industria automovilística; este elemento metálico trae como consecuencia en la salud pública efectos neurológicos, hematológicos, endocrinos, renales, sobre la reproducción y el desarrollo, y efectos cancerígenos (ATSDR, 1995).

Diversos reportes de investigación locales y nacionales indican que los sedimentos del lago Titicaca contienen elementos metálicos como el plomo, en el que se encontró hasta 143,8 y 153,3 mg/kg (UNALM, 1999), alcanzando incluso a los 200 mg/kg (Loaiza y Galloso, 2008). Estas cifras metálicas vienen alterando el ecosistema acuático del Titicaca.

Cañizares (2000) menciona que los metales pesados son esenciales para el crecimiento y el

metabolismo microbiano en bajas concentraciones (cobre y zinc), mientras que a otros no se les conoce función biológica (oro, plata, plomo y cadmio); sin embargo, las células vivas presentan una gran variedad de mecanismos para la acumulación, el transporte, la formación de complejos extracelulares, o la precipitación de metales pesados. Por otra parte, existen reportes que mencionan que los hongos poseerían habilidades de captación de metales pesados, gracias a que en su pared celular contienen diversos componentes quelantes tales como grupos carboxilos, fosfatos, amidas, tioles, hidroxilos, quitina, gluco-proteínas, las cuales jugarían un rol importante en la bioadsorción de metales pesados (Arica et ál., 2004).

Teniendo en cuenta los antecedentes revisados, la aplicación de técnicas de biorremediación utilizando microorganismos tales como las levaduras, se constituiría en una alternativa de solución para captar iones de plomo en soluciones acuosas. Posteriormente sería adaptado para realizar la mitigación y el control de plomo en las aguas y los sedimentos del Titicaca. Por ello, los objetivos del presente estudio fueron determinar la capacidad de bioadsorción de plomo por *Saccharomyces cereviceae* en soluciones acuosas, y evaluar la influencia del pH en dicho proceso de bioadsorción.

Materiales y métodos

El microorganismo utilizado para los estudios de bioadsorción fue la levadura *Saccharomyces cerevisiae* CM-05, levadura de venta comercial y liofilizada.

Activación y preparación de las suspensiones de levaduras

Las levaduras liofilizadas fueron activadas en un matraz erlenmeyer que contenía 100 mL de agua destilada desionizada, luego se agregó 1 g de sacarosa, a continuación se realizó la agitación, seguidamente la boca del matraz se tapó con papel aluminio para posteriormente colocarlo en la estufa a 27 °C por un lapso aproximado de 20 min, hasta que el líquido presentara burbujas.

Con ayuda de un hemocitómetro se procedió a preparar las suspensiones del microorganismo por conteo de células en los cuadrantes, obteniéndose finalmente líquidos con levaduras en suspensión de 2×10^6 y 5×10^6 cel/mL (células / mililitro).

Preparación de soluciones de plomo

Las soluciones experimentadas se prepararon a partir de una solución concentrada de 100 mg/L de plomo. Ésta fue preparada pesando 0,1598 g de $Pb(NO_3)_2$, los cuales fueron disueltos en 1000 mL de agua destilada desionizada para laboratorio marca Diamedsa ®. Seguidamente se prepararon soluciones de 5 y 25 mg/L de plomo a partir de la solución concentrada utilizando la ecuación

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

Donde: V = Volumen; C = Concentración

Metodología para la bioadsorción experimental

Los procedimientos ejecutados a continuación se basaron en los reportes de diversos antecedentes revisados. En un matraz erlenmeyer se colocaron 100 mL de la solución de plomo (5 mg/L). Seguidamente se ajustó el pH de las soluciones a 3,26; 5,14 y 6,70 con HCl o NaOH 0,01 M con la finalidad de determinar el pH óptimo para la bioadsorción del metal pesado. Luego se adicionaron 50 mL de la suspensión de levaduras 2×10^6 cel/mL. Estos tratamientos fueron reali-

zados a temperatura ambiente (aproximadamente 12 °C) en un shaker a 80 rpm. Para determinar la eficacia de la bioadsorción con respecto al tiempo de contacto se tomaron alícuotas de 50 mL a los 5, 60 y 120 minutos. Estas alícuotas finalmente fueron centrifugadas a 3500 rpm para separar las levaduras, y en el sobrenadante se determinó la concentración del metal. De igual forma se realizaron todos los restantes tratamientos de pH, suspensión de levaduras y tiempos de contacto. Este trabajo se ejecutó con tres repeticiones.

Cuantificación de plomo en soluciones acuosas

La cuantificación de plomo se realizó mediante la técnica de complexometría, que constó de los siguiente procedimientos: se pipetearon 2 mL de la solución sobrenadante a matraces Erlenmeyer de 250 mL, a los cuales se les añadieron 0,2 g de ácido tartárico y se neutralizó por adición de NaOH 2 N, utilizando un potenciómetro. Luego se añadieron 5 mL de tampón fosfato de pH 10, 10 mL de KCN al 5% y 0,1 g de eriocromo negro T. La solución se tornó a una coloración violeta. La titulación se realizó con EDTA 0,01 M utilizando una bureta automática marca Metrohm, hasta lograr el viraje a una solución de color azul, indicando que la titulación terminó. El gasto de 1 mL de EDTA 0,01 M indicó que la solución contenía 2,0721 mg de plomo (Schwarzenbach y Flaschka, 1969). Esta metodología se aplicó a todos los tratamientos de pH, suspensión de levaduras y tiempos de contacto.

Cálculo de la eficiencia de bioadsorción

La eficiencia de bioadsorción (EBA) se determinó con la siguiente ecuación:

$$EBA = \frac{[Pb_0] - [Pb_f]}{[Pb_0]} \times 100$$

Donde: Pb_0 = concentración de plomo inicial en la solución acuosa; Pb_f = concentración de plomo final en la solución acuosa.

Análisis estadístico

Con la finalidad de evaluar la influencia de las suspensiones celulares y el pH en el proceso de bioadsorción del plomo, se realizaron pruebas de correlación utilizando el software Statgraphics Plus for Windows 4,0.

Resultados y discusión

Capacidad de bioadsorción de plomo en concentraciones de 5 y 25 mg/L mediante dos suspensiones de *Saccharomyces cereviceae* (2×10^6 y 5×10^6 cel/mL) en tres tiempos consecutivos de contacto (5, 60 y 120 minutos).

En la tabla 1 se observa que la mayor concentración de levaduras, de 5×10^6 células/mL, resultó mejor en la bioadsorción de plomo en los dos niveles de concentración de plomo, llegando incluso a absorber entre el 50,68 a los 5 minutos y el 90,16% a los 120 minutos; por otra parte, la bioadsorción aumenta con el transcurso del tiempo, lográndose los mejores resultados a los 120 minutos.

Gutiérrez et ál. (2005), mencionan que diversos factores influyen en la bioadsorción de

metales pesados usando biomasa fúngica. Entre estos factores se incluyen las propiedades químicas de la superficie celular y las condiciones físico-químicas de la solución, entre ellas el pH, la temperatura, la concentración inicial del metal, la fuerza iónica, entre otros. Evaluando el efecto de la temperatura de la solución, estos autores reportan que se obtuvo la máxima bioadsorción de plomo a los 25 °C con biomasa seca de *Saccharomyces cereviceae*, lo cual indica que la retención del metal está gobernada por un proceso de adsorción física; en contraste con los resultados del presente trabajo, que se realizó a temperatura ambiental de la región del altiplano peruano, presentó como promedio 12 °C; por otra parte, se trabajó con biomasa viva de *Saccharomyces cereviceae*, sugiriendo que la biomasa seca de la levadura sería más efectiva que la biomasa viva en la bioadsorción de plomo.

La bioadsorción del plomo se debe a que la superficie celular de *Saccharomyces cereviceae* contiene sitios activos o de captación que presentan una gran afinidad por el plomo, éstos se encuentran entre los diferentes constituyentes de la pared celular (Brady et ál., 1994).

Tabla 1. Eficiencia de bioadsorción de plomo en soluciones iniciales de 5 mg/L luego de los tratamientos con *Saccharomyces cereviceae*.

| <i>Saccharomyces cereviceae</i> (cel/mL) | pH | Tiempos de contacto (minutos) | Concentración de plomo (mg/L) | Eficiencia de bioadsorción (%) |
|--|------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | 3,26 | 0 | 5,00 | 0,00 |
| | | 5 | 4,79 | 4,20 |
| | | 60 | 4,89 | 2,20 |
| | | 120 | 4,81 | 3,80 |
| 2×10^6 | 5,14 | 0 | 5,00 | 0,00 |
| | | 5 | 2,13 | 57,4 |
| | | 60 | 1,08 | 78,4 |
| | | 120 | 1,10 | 78,0 |
| | 6,70 | 0 | 5,00 | 0,00 |
| | | 5 | 4,90 | 2,00 |
| | | 60 | 4,87 | 2,60 |
| | | 120 | 4,87 | 2,60 |

Tabla 2. Eficiencia de bioadsorción de plomo en soluciones iniciales de 25 mg/L luego de los tratamientos con *Saccharomyces cereviceae*.

| <i>Saccharomyces cereviceae</i> (cel/mL) | pH | Tiempos de contacto (minutos) | Concentración de plomo (mg/L) | Eficiencia de bioadsorción (%) |
|--|------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | 3,26 | 0 | 25,00 | 0,00 |
| | | 5 | 24,89 | 0,44 |
| | | 60 | 24,92 | 0,32 |
| | | 120 | 24,91 | 0,36 |
| 5 x 10 ⁶ | 5,14 | 0 | 25,00 | 0,00 |
| | | 5 | 12,33 | 50,68 |
| | | 60 | 8,65 | 65,40 |
| | | 120 | 2,46 | 90,16 |
| | 6,70 | 0 | 25,00 | 0,00 |
| | | 5 | 23,50 | 6,00 |
| | | 60 | 23,90 | 4,40 |
| | | 120 | 23,80 | 4,80 |

Evaluación de la influencia del pH en la bioadsorción de plomo

Los resultados de la influencia del pH sobre la eficiencia de bioadsorción de plomo por *Saccharomyces cereviceae* se muestran en las figuras 1 y 2. Existe mucha diferencia entre los resultados de los tratamientos planteados a diferentes pH, observándose que el pH óptimo para la bioadsorción de plomo fue de 5,14 con un alto índice de correlación entre estas dos variables ($r = 0,98$); mientras que los pH más ácidos (3,26) y cercanos a la neu-

tralidad (6,70) influyen negativamente en la bioadsorción.

Los resultados obtenidos difieren con los reportados por Palacios y Villalobos (2007), en razón de que estos autores determinaron el pH 6,5 como óptimo para la bioadsorción de plomo en soluciones de 20 mg/L, a pesar de haber trabajado con la misma cepa (CM - 05). Por otra parte, la máxima eficiencia de bioadsorción (13,52%) la reportan a los 4 min del tiempo de contacto, en contraste con el presente trabajo en el que se obtuvo el 90,16% de bioadsorción

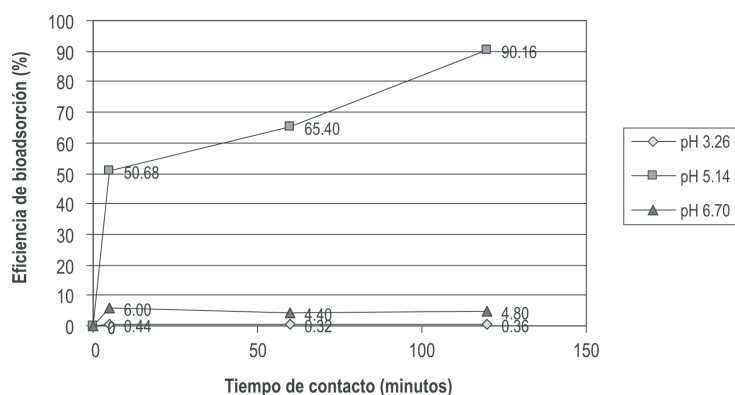


Figura 1. Eficiencia de bioadsorción de plomo en soluciones iniciales de 5 mg/L luego de los tratamientos con *Saccharomyces cereviceae* a pH diferentes

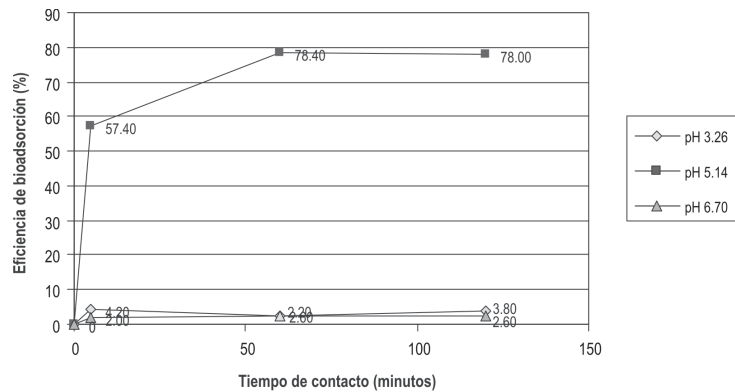


Figura 2. Eficiencia de bioadsorción de plomo en soluciones iniciales de 25 mg/L luego de los tratamientos con *Saccharomyces cereviceae*.

a los 120 min. Lo que podría estar influyendo en este proceso lento de bioadsorción es la temperatura ambiental (12 °C promedio) en la que se realizó el presente estudio.

En el trabajo de investigación se observa una fuerte influencia del pH 5,14 en el proceso de bioadsorción de plomo, esto se debe a los grupos funcionales presentes en las paredes celulares de *S. cereviceae*, que están sujetos al efecto del pH debido a la competencia con iones intercambiables por los centros activos ionizables (Navarro et ál., 2006). Entre los grupos funcionales que presentan características quelantes se mencionan los grupos carboxilos, fosfatos, amidas, tioles, hidroxilos, quitina, gluco-proteínas, los cuales juegan un rol importante en la bioadsorción de metales pesados (Arica et ál., 2004). Se debe considerar que los sitios de adsorción metálica en la superficie celular, y la disponibilidad de metal en una solución, son afectados por el pH (Ahuja et ál., 1999).

El pH 5,14 fue el óptimo para la bioadsorción de plomo, y coincide con lo que reportan Navarro et ál. (2006), al afirmar que se presenta mayor capacidad de bioadsorción a pH menores de 6, esto se explica por el efecto del pH en la especiación química del ión en soluciones acuosas. Por otro lado, Parvathi et ál. (2006) reportan que la captación de plomo se incrementó gradualmente con la elevación del pH inicial, y concluyen que el valor más alto de captación

de plomo se encontró a pH 5 con 2,109 mg/g de *Saccharomyces cereviceae*, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo.

En contraste con estos antecedentes, Gutiérrez et ál. (2005) mencionan que a pH 5,0 se presentó la mayor tasa de bioadsorción de plomo (85%) en los primeros cinco minutos por parte de la biomasa seca de *Saccharomyces cereviceae*, y que en valores de pH inferiores o superiores a éste, la retención de plomo disminuye. Estos resultados concuerdan con los presentados en las tablas 1 y 2. Así mismo, estos autores refieren que a pH debajo de 5,0 los hidrógenos compiten con el ión plomo por los sitios activos de la superficie de la pared celular de la levadura; a pH mayores de 5,0 se presenta el reflejo de dos procesos: la bioadsorción de plomo por parte de la célula, y la precipitación del mismo como hidróxido de plomo, ya que se observó que a pH cercanos y superiores a 7,0, el plomo comienza a precipitarse, por los OH⁻ del medio.

Estas comparaciones entre los resultados obtenidos en el presente trabajo y los diversos antecedentes, originan muchas interrogantes con diversas respuestas aún no claras, pues se desconoce qué otros factores influyen en la bioadsorción de metales pesados mediante la utilización de *Saccharomyces cereviceae*, razón por la cual quedan pendientes muchos tratamientos experimentales para dilucidar estos fenómenos.

Conclusiones

La levadura *Saccharomyces cereviceae* en una suspensión líquida igual a 5×10^6 cel/mL; presentó una eficiencia de bioadsorción de entre el 50,68 y 90,16% en un tiempo de contacto de 5 y 120 min respectivamente.

El pH óptimo para la bioadsorción de plomo por levaduras fue 5,14, disminuyendo en los dos restantes pH experimentados (3,26 y 6,70).

Las levaduras estudiadas se proponen como una alternativa válida para tratar la contaminación por plomo en los cuerpos acuáticos.

Se sugiere realizar la validación de la tecnología propuesta para la remoción de plomo utilizando levaduras en la región del altiplano peruano.

Referencias bibliográficas

- Ahuja, P., Gupta, R., Saxena, R. 1999. Sorption and desorption of cobalt by *Oscillatoria angustissima*. *Current Microbiology* 39 (1): 49-52.
- Arica, M., Bayramoglu, G., Yilmaz, M., Bektas, S., Genc, Ö. 2004. Biosorption of Hg^{+2} , Cd^{+2} and Zn^{+2} by Ca – alginate and immobilized wood – rooting fungus *Funalia trogii*. *Journal of Hazardous Materials* 109: 191-199.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1995. Case studies in environmental medicine: lead toxicity. Atlanta.
- Brady, D., Stoll, A., Duncan, J. 1994. Biosorption of heavy metal cations by non – viable yeast biomass. *Environmental Technology* 15: 429-438.
- Cañizares, R. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, San Pedro Zacatenco, México. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42: 131-143.
- Gutiérrez, M., González, L., Sánchez, E., Mellado, D. 2005. Biosorción de Pb^{+2} , por biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Informe de Investigación. Laboratorio de Investigación de Química y Bioquímica. Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, México.
- Kiely, G. 1999. Ingeniería ambiental. Fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión. Madrid: McGraw Hill.
- Loaiza, E., Galloso, A. 2008. Implicancias ambientales por la actividad minera de la zona de Ananea en la cuenca del río Ramis. *Ingemmet. Boletín No. 5 Serie E Minería*. Navarro, A., Ramos, K., Campos, K., Maldonado, H. 2006. Elucidación del efecto del pH en la adsorción de metales pesados mediante biopolímeros naturales: cationes divalentes y superficies activas. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 7 (2): 113-126.
- Palacios, E., Villalobos, L. 2007. Biosorción de metales pesados en solución acuosa mediante la biomasa de *Saccharomyces cereviceae*. Tesis de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de las Américas. Puebla, México.
- Parvathi, K., Nagendran, R., Nareshkumar, R. 2006. Lead biosorption onto waste beer yeast by – product, a means to decontaminate effluent generated from battery manufacturing industry. *Journal of Biotechnology* 10 (1): 92-105.
- Schwarzenbach, G., Flaschka, H. 1969. *Complexometric Titrations*. 2 ed. Translated by Irving H. M. N. H., and Metheun. London.